



Title	Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced gH2AX accumulation
Author(s)	中谷, 庸寿
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53921
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中谷 庸寿
論文題名 Title	Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced γ H2AX accumulation (マウス受精卵におけるStellaの雌性ゲノム保護とその初期胚発生への重要性)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 受精後、卵子由来の雌性ゲノムでは、DNA複製に伴い受動的なDNA脱メチル化が生じるのに対し、精子由来の雄性ゲノムでは、DNAの複製開始以前から能動的な脱メチル化が生じる。この能動的なDNA脱メチル化は、Tet3による、5-methylcytosine (5mC) の5-hydroxymethylcytosine (5hmC) への変換を介して生じる。 Stella (PGC7, Dppa3) は、初期胚及び生殖系列の細胞で特異的に発現する蛋白で、胚発生に必須である。我々は、Stellaを欠損するマウスの受精卵では、雄性ゲノムだけでなく雌性ゲノムもTet3により5hmCへ変換されることから、Stellaが雌性ゲノムをTet3から保護する役割をもつことを報告してきた。しかし、Stella欠損胚で観察される胚発生停止がDNAメチル化異常に起因するかどうかは不明であった。そこで本研究では、異常なエピジェネティクス制御と発生の異常を関連付ける分子機構の解明を目的として、Stella欠損胚の詳細な解析を行った。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 Stella欠損胚において生じるクロマチンの異常を詳細に解析するため、4D イメージングシステムにより初期胚を解析した。その結果、Stella欠損胚では、異常染色体分離: Abnormal Chromosome Segregation (ACS) が、8細胞期までの間に高頻度で生じることが明らかとなった。1~8細胞期におけるACSは胚発生停止の原因になることから、Stella欠損胚での胚発生停止は、ACSによるものであることがわかった。 Stella欠損胚で観察されるACSの原因を明らかにするため、分離した染色体が精子あるいは卵子のいずれに由来するかを免疫染色法にて解析した。雌性クロマチンにのみ存在することがわかっているヒストンH3の9番目のリジンのジメチル化 (H3K9me2) は、Stella欠損胚で観察される分離染色体で陽性であった。このことから、Stella欠損胚におけるACSは雌性クロマチンの異常に由来することを明らかにした。 ACSはDNA複製の遅延により引き起こされることが知られている。そこで、Stella欠損胚でもDNA複製に異常があるかどうかを、BrdUの取り込みにより解析した。その結果、すべてのコントロール受精卵のDNA複製が受精後12時間までに終了していたのに対して、Stellaを欠損する受精卵では顕著なDNA複製の遅延が認められた。以上の結果は、Stella欠損胚におけるACSがDNA複製の遅延によって引き起こされたことを示している。 さらに、Stella欠損胚で観察されるDNA複製遅延の原因を明らかにするため、受精卵において5hmCと同様の動態を示すヒストン修飾であるγH2AXについての解析をおこなった。γH2AXは、DNA傷害によって形成されるだけでなく、DNA複製を阻害することも報告されている。免疫染色法によりγH2AXの局在を解析したところ、コントロール受精卵の雌性前核においてγH2AX fociがほとんど認められなかったのに対し、Stella欠損受精卵の雌性前核では異常な蓄積が認められた。また、受精卵においてsiRNAを用いたTet3のノックダウン実験をおこなったところ、γH2AX fociの減少が認められた。以上から、受精卵では、Tet3がγH2AXの集積に関与していることが明らかとなった。 最後に、γH2AXの蓄積と5hmCの関係について、NIH-3T3細胞を用いて詳細な検討をおこなった。Tet3は酸化反応により5mCを5hmCへ、さらに5-formylcytosine (5fC) を経て5-carboxylcytosine (5caC) へと変換する。そこで、Tet3、及びTet3の酵素活性欠損変異体を強制発現させ、これら5mC代謝物の蓄積を確認した。その結果、酵素活性依存的に5hmCの蓄積が確認されたが、5fC及び5caCの蓄積は認められなかった。このTet3の強制発現細胞では、γH2AXが蓄積していたことから、DNA複製の抑制は酵素活性依存的であることがわかった。 〔総括(Conclusion)〕 Stella欠損受精卵では、雄性ゲノムだけでなく雌性ゲノムにおいても5mCが5hmCへ変換され、同時に生じるγH2AXがDNA複製の異常や、ACSを引き起こすことがわかった。すなわち、受精後のStellaによるTet3からの雌性ゲノムの保護は、正常な胚発生に必須であることを明らかにすることができた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中谷 庸寿			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	山田 隆夫
	副 査	大阪大学教授	宇野 重吉
	副 査	大阪大学教授	月田 早智子

論文審査の結果の要旨

本研究は、受精卵におけるエピジェネティック制御機構の一端を明らかにし、それが胚発生過程においてどのように関わるかをまとめたものである。学位申請者は、受精卵で高発現するタンパク質であるStella/PGC7を詳細に解析することで、雌性ゲノムのメチル化保護が胚発生過程でのDNA複製及びクロマチン分配を正常に行うために必須であることを明らかにした。また、能動的脱メチル化の過程で生じるヒドロキシメチル化シトシンが、ヒストンH2AXのリン酸化体であるγH2AXの蓄積を誘導することでDNA複製を阻害することを見出した。

これらの内容は、初期胚に関する特殊な操作技術と深い知識がなければ達成されない成果を含んでおり、正常発生におけるエピジェネティックリプログラミング機構の解明に大きく貢献するものである。したがって、申請者は博士（医学）の学位を付与されるに十分な資格を有するものと判断した。